

HBsAg'nin Saptanmasına Yönelik İmmunoreal Time PCR Tabanlı Bir Test Geliştirilmesi

Mert Ahmet Kuşkucu¹ , Kenan Midilli¹ , Kemal Altaş²

1 İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

2 Haliç Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

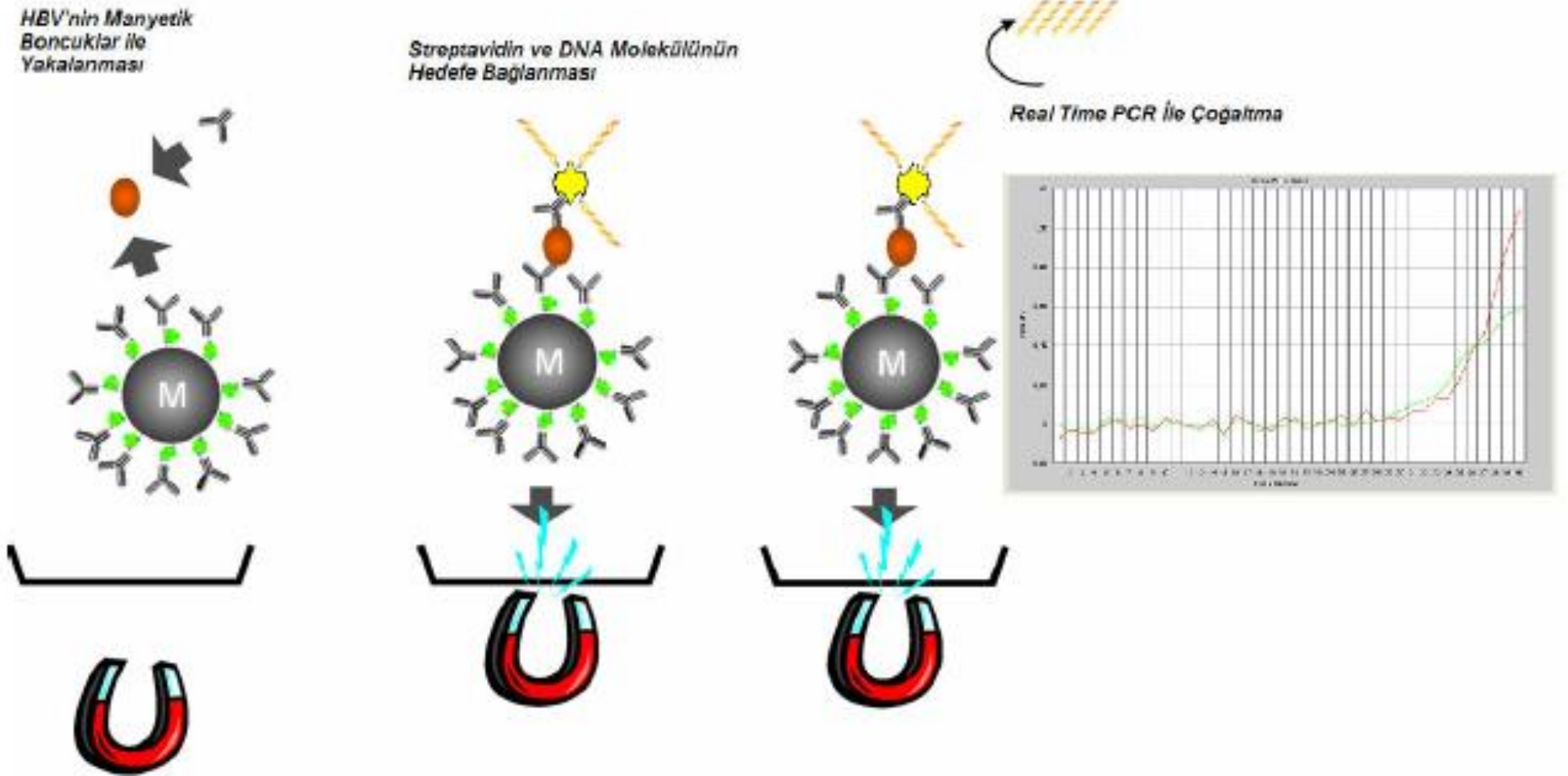
Giriş ve Amaç

- HBsAg, HBV infeksiyonunun serolojik tanısının en önemli belirtecidir, bununla birlikte güncel enzim immünoassaylerin (ELISA) duyarlılık problemleri bulunabilmektedir.
- Bu çalışmada HBsAg'yi "ImmunoReal Time PCR" (iRt-PCR) yöntemi ile saptayabilecek özgün ve duyarlı bir yöntemin geliştirilmesi amaçlandı.

Gereç Yöntem

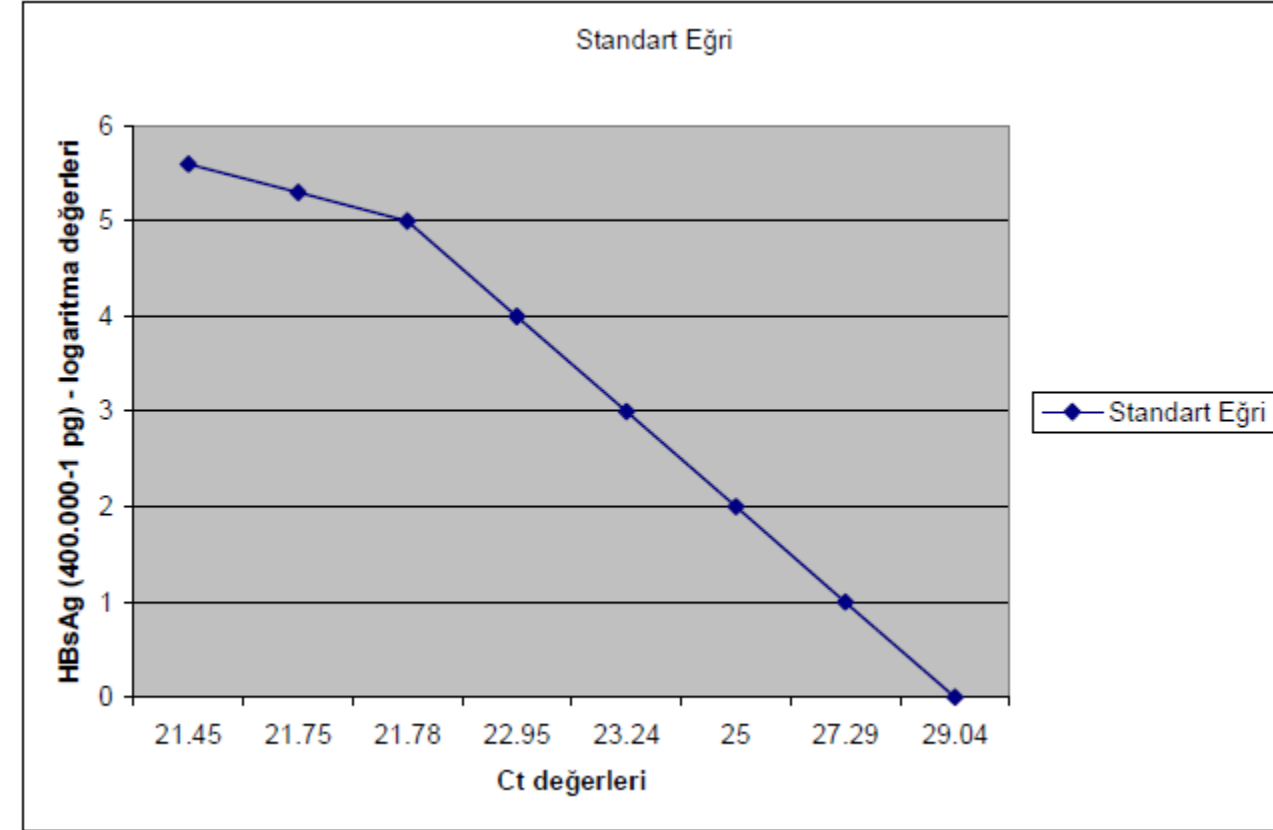
- HBsAg'nin 1-400.000 pg'lık dilüsyon serisi (400.000, 200.000, 100.000, 10.000, 1.000, 100, 10 ve 1 pg/ml olacak şekilde düzenlenmiştir) hazırlandı.
- Testler dilüsyonlar için üç kere tekrarlandı, 3 tekrarın ortalama Ct değerleri ve pg/ml cinsinden HBsAg miktarının negatif logaritması alınarak standart eğri çizildi.
- Eş zamanlı olarak 30 HBsAg, HBV DNA negatif, 30 HBsAg, HBV DNA pozitif ve 24 izole anti-HBC pozitif hasta test edilerek yöntemin performansı değerlendirildi.

Geliştirilen İmmunoreal Time PCR Testi



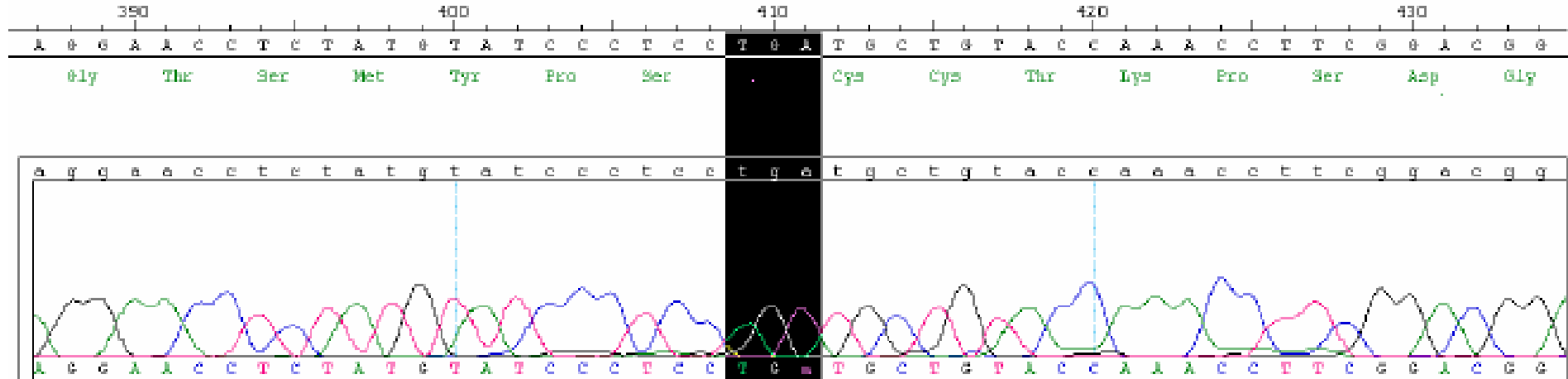
Bulgular;

- Bulgular Yapılan dilüsyonlarda testin 400.000-100.000 pg/ml'lik konsantrasyonlarda anlamlı bir ayırım yapamadığı, bu konsantrasyonlarda testin Ct değerlerinin çok yakın olduğu ve testin doyuma ulaştığı gözlemlendi.
- Testin 100.000-10 pg/ml arasında lineer bir eğri oluşturduğu gözlemlendi ve kantitasyon için dinamik aralık 100.000-10 pg/ml olarak belirlendi.
- HBsAg miktarı 1 pg/ml olan 2 örnekte pozitif sonuç saptanamazken 1 testte pozitif sonuç saptandı. Bu nedenle testin saptama limiti 10 pg/ml olarak belirlendi.



Bulgular

- Test edilen 30 HBsAg, HBV DNA negatif örnekte sinyal saptanmazken, 30 HBsAg, HBV DNA pozitif örnekte sinyal saptandı.
- İzole anti-HBC pozitif hastaların DNA pozitif olanlarının biri dışında (bu örnekte S proteininde stop kodon mutasyonu vardı) tümü iRt-PCR yöntemi ile pozitif bulundu.



Sonuç

- Optimize ettiğimiz, iRt-PCR protokolünün analitik duyarlılığını klasik ELISA (200-400 pg/ml) yönteminden 20-40 kat daha (10 pg/ml) yüksek bulduk.

Bununla birlikte “a” antijenik determinantında dünyada ilk olarak C137 erken “stop” kodon mutasyonu saptanması dikkat çekicidir.

← → ↻ <https://hivdb.stanford.edu/HBV/DB/cgi-bin/gbReferenceHBVRT.cgi>

HBV RT: BLAST Hits

Click a link in 'RefID' column to download sequences or to browse genbank notes and mutation list. Click a link in 'Authors' column to access a published paper. Click a link in '# in GB' column to access genbank entries.

Authors	Title	Citation	E-value	# in HBVDB	# in Gb	% in HBVDB	Annotation
Kuskucu (2009)	Detection of HBsAg in Isolated Anti-HBC Positive Patients with Immuno-Real Time PCR and Investigation of 'a' Determinant Mutations	Unpublished	1e-108		7	0	Gene fragment(s)
Midilli (2009)	First description of HBV Genotype A in Turkey	Unpublished	0		1	0	Unpublished

Team

- [Citing the HIV Drug Resistance Database](#)
- [People](#)
- [Terms of Use / FAQs](#)
- [Publications](#)
- [Acknowledgements](#)
- [News](#)

Resources

- [User Guide & Database Documents](#)
- [Database Statistics](#)
- [HIV Treatment Websites](#)
- [RT, protease and integrase structures](#)
- [Additional Resources](#)

